

Title	The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity
Author(s)	花房, 崇明
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59064
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	はな たか あき 花 房 崇 明
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 1 1 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	The predominant drug-specific T-cell population may switch from cytotoxic T cells to regulatory T cells during the course of anticonvulsant-induced hypersensitivity (抗痙攣薬による薬疹の経過中、薬剤特異的T細胞は細胞障害性T細胞から制御性T細胞へ移行する可能性がある)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 片山 一朗 (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 坂口 志文

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

Stevens-Johnson症候群 (SJS)、中毒性表皮壊死症 (TEN)、薬剤性過敏症候群 (DIHS) といった重症薬疹ではT細胞による遅延型過敏反応が重要な役割を果たしている。³H-thymidineを用いた薬剤によるリンパ球幼若化試験 (DLST) は薬疹における被疑薬を同定するために臨床的に用いられている。私は重症薬疹における免疫反応の詳細を明らかにするため、従来のDLSTにおいて細胞増殖の指標として用いられている³H-thymidine の代わりに、CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) で薬疹患者末梢血単核球 (PBMC) を標識し、³H-thymidine の非放射性同位体であるBrdU (bromodeoxyuridine) の取り込みを指標にすることで、少数の薬剤特異的T細胞であっても適確に解析しうる、フローサイトメトリー (FCM) を用いたDLSTを新規に開発した。

〔 方 法 〕

2008年8月から2011年7月までの間、大阪大学医学部附属病院皮膚科を受診した薬疹151症例について、従来の³H-thymidineを用いたDLSTと、FCMを用いたDLST (FCM-DLST) とを同時に並行して行った。従来のDLST及びFCM-DLSTでは共に段階希釈した被疑薬 (100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml) と、CFSEで標識した患者PBMCを7日間混合培養した。従来のDLSTでは、³H-thymidineを培養6日目に添加し、その取り込み量 (count per minute: cpm) を添加20-24時間後の培養7日目に測定した。薬剤非添加群のcpmに対する薬剤添加群のcpm

の比率をStimulation Index (SI) として定義し、SIが200%以上の場合にDLST陽性とした。一方従来のDLSTと並行して行ったFCM-DLSTでは、培養6日目に³H-thymidineの代わりにBrdUを添加し、20-24時間後の培養7日目にanti-BrdU抗体、anti-CD4抗体、anti-CD8抗体で染色し、CFSEの希釈と併せてFCMで解析を行った。

〔 成 績 〕

抗瘰癧薬による薬疹16症例について着目したところ、従来のDLSTでは、同一症例においても病期によって、SIが大きく変動しており、従来のDLSTにおける薬剤特異的な免疫反応は病型や病期によって異なることが示唆された。16症例中、6症例(DIHS: 3症例、SJS:1症例、播種状紅斑丘疹型薬疹(MP):1症例、多形紅斑型薬疹(EM):1症例)で、従来のDLSTにおけるSI値と相関して、薬剤と混合培養することで分裂、増殖している薬剤特異的T細胞を、CFSEが希釈されBrdUを取り込んでいる細胞集団 (CFSE^{low} BrdU^{high}) としてFCM-DLSTを用いることで同定することができた。CFSEは細胞分裂する毎にその蛍光強度が半分に減弱するため、CFSE標識することで細胞分裂の回数を評価することが可能になるが、6症例において薬剤特異的T細胞は培養7日間で平均約5.5回分裂していた。CFSEの希釈のみならず、BrdUの取り込みを加えて評価することで死細胞などの非特異的なCFSE^{low} BrdU^{low}細胞を除外することが可能になり、より明確に薬剤特異的T細胞をCFSE^{low} BrdU^{high}として同定することが可能になった。回復期のDIHS(3症例)、MP(1症例)、EM (1症例)では、薬剤特異的T細胞はCD4⁺ T細胞であった一方、SJS(1症例)やDIHS(1症例)といった重症薬疹の急性期では、CD8⁺T細胞(CTL)が優位であった。DIHSにおいては、急性期から回復期への経過中に、薬剤特異的T細胞がCD8⁺ CTLからCD4⁺T細胞へ劇的に移行し、回復期では分裂細胞中の薬剤特異的CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺制御性T細胞 (Treg)の割合が増加していた。

〔 総 括 〕

新規に開発したCFSEの希釈とBrdUの取り込みを評価するFCM-DLSTによって、わずかな薬剤特異的T細胞の解析が可能になった。症例数は限られているが、単一の原因薬剤が、MHC class IとMHC class IIを介して、それぞれ薬剤特異的なCD8⁺CTLとTregを含むCD4⁺T細胞とに抗原提示され、原因薬剤の中止が契機となり、薬剤に対する生体の細胞応答がeffector T細胞からTregに移行するというこれまで知られていなかった薬剤過敏反応の新たなメカニズムがFCM-DLSTを用いた本研究で明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

重症薬疹における免疫反応の詳細を明らかにするため、薬疹患者末梢血単核球(PBMC)を細胞増殖マーカーとしてCFSEとBrdUの両方で標識することにより、フローサイトメトリー(FCM)を用いた薬剤によるリンパ球幼若化試験(DLST)を新規に開発した。抗瘰癧薬による薬疹16症例における薬剤特異的T細胞を解析したところ、6症例で薬剤特異的T細胞を検出し、4症例でCD4⁺T細胞が優位であった。一方、Stevens-Johnson症候群や薬剤性過敏症症候群(DIHS)といった重症薬疹の急性期では、CD8⁺T細胞(CTL)が優位であった。DIHSでは経過中に、薬剤特異的T細胞がCTLからCD4⁺T細胞へ移行し、回復期では分裂細胞中の薬剤特異的制御性T細胞(Treg)の割合が増加していた。FCMを用いたDLSTによって、少数の薬剤反応性T細胞であっても適確に解析することが可能になった。単一の原因薬剤が、MHC class IとMHC class IIを介して、それぞれ薬剤特異的なCD8⁺CTLとTregを含むCD4⁺T細胞とに抗原提示され、原因薬剤の中止が契機となり、薬剤に対する生体の細胞応答がeffector T細胞からTregに移行するという薬剤過敏反応の新たなメカニズムが本研究で明らかとなり、学位の授与に値すると考えられる。